Purification d'une protéine à ancrage membranaire glycolipidique : la phosphatase alcaline d'intestin de bœuf

Pascale Chenevier
sous la direction de Mme Anne Briolay et M. Bernard Roux

30 octobre 1996

Je tiens à remercier M. Bernard Roux pour m'avoir accueillie dans son laboratoire,
tous les chercheurs du laboratoire de Physicochimie Biologique pour la patience avec laquelle
ils ont affronté les questions déconcertantes de la chimiste que je suis,
et particulièrement Mme Anne Briolay
qui a essuyé mes maladresses durant de nombreuses semaines.
J'ai redécouvert grâce à eux que chimie et biochimie sont voisines et complices, bien que
l'enseignement qu'on en fait tende à les séparer et j'espère que ce rapport donnera à d'autres
l'envie de tenter l'aventure.

Table des matières

Liste des abréviations

PA Phosphatase Alcaline

AcPA Anticorps anti-phosphatase alcaline

GPI GlycosylPhosphatidylInositol

OG Octyl-βD-Glucopyranoside (détergent non ionique)

PNPP ParaNitroPhénylPhosphate

PNP ParaNitroPhénol

U Unité de mesure de l'activité enzymatique de la PA. C'est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 μM de PNPP par minute à $37°C$.

Tx Triton X–100 (détergent non ionique)

SDS Sodium DodécylSulfate (détergent ionique)

SDS–PAGE Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide en présence de SDS

BSA Albumine de Sérum de Bœuf

Rappels bibliographiques

Le laboratoire de Physicochimie Biologique s'intéresse aux membranes biomimétiques et à l'ancrage orienté des protéines membranaires: un des sujets d'étude est la caractérisation tant enzymologique que physicochimique des interactions entre membranes et ancrages de protéines. À cet égard, une protéine à pied d'ancrage de type GlycosylPhosphatidylInositol (GPI) [1] disponible à l'état pur et en grande quantité leur serait un bien précieux. La mise au point de la préparation d'une telle protéine a donc été confiée à Muriel Bortolato et Anne Briolay, que j'ai secondées pendant mon stage. Le travail exposé ici poursuit leurs efforts engagés depuis deux ans dans la purification de la Phosphatase Alcaline (PA) d'intestin de boeuf sous sa forme native. L'enzyme purifiée est ultérieurement utilisée pour l'étude :

- des effets des phospholipides et autres constituants membranaires sur son activité ;
- de son incorporation dans des liposomes ;
- de ses différentes glycosylations ;
- de sa conformation et de la formation de dimères et tétramères...

Une méthode générale pour des cas particuliers

La purification de toutes les protéines membranaires suit le même schéma directeur : une phase d'extraction solubilise la protéine grâce à l'action d'un détergent; la solution obtenue est ensuite purifiée par une ou plusieurs chromatographies. Les chromatographies d'exclusion-diffusion et d'échange d'ions sont les plus grossières; des chromatographies hydrophobes sont parfois utilisées; mais les chromatographies par immunoaffinité sont les méthodes de choix à cause de leur grande sélectivité.

Les colonnes de chromatographie d'affinités sur colonne d'anticorps immobilisés sont toujours difficiles à utiliser de façon optimale. Les anticorps proviennent du sérum sanguin d'un animal auquel l'antigène a été injecté : la composition chimique du mélange est donc grandement incertaine. De plus l'affinité des anticorps pour leur antigène est très variable. Enfin, les protéines résistent plus ou moins bien aux éluants parfois aggressifs qu'on doit leur imposer pour les désorber. Les résultats obtenus sur une protéine sont donc difficilement transposables à une autre protéine.

Les spécificités de l'ancrage GlycosylPhosphatidylInositol

Les premières protéines à ancrage GPI isolées furent solubilisées dans le butanol [9]. Elles ont permis de déterminer la structure chimique du pied d'ancrage donnée dans la figure 0.1. Le pied GPI et la protéine sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique. La protéine est rattachée à la membrane par un pied d'ancrage peptidique C–terminal transitoire. L'acquisition du pied par la protéine (la glypiation) se fait après la transcription par transestérification : la protéine est détachée du pied peptidique en un site de coupure spécifique puis liée au pied GPI par sa

1. un type spécifique d'ancrage membranaire de protéines (voir partie bibliographique).

nouvelle extrêmité C–terminale. Cette forme d'ancrage est donc spécifique aux eucaryotes; les méthodes génétiques qui permettent la surexpression d'un gène d'intérêt dans une bactérie ne peuvent être envisagées ici.

Pour détecter la présence d'un pied GPI sur une protéine disponible en faible quantité, la digestion par la PhosphatidylInositol–PhosphoLipase C (PI–PLC) est la méthode la plus accessible [9]. Cette enzyme exprimée par des bactéries hydrolyse la liaison phosphate du pied GPI marquée par une flèche sur le schéma 0.1. Les protéines à pied GPI peuvent aussi être caractérisées par leurs solubilités spécifiques dans les détergents [3] ou par marquage isotopique des constituants du pied.

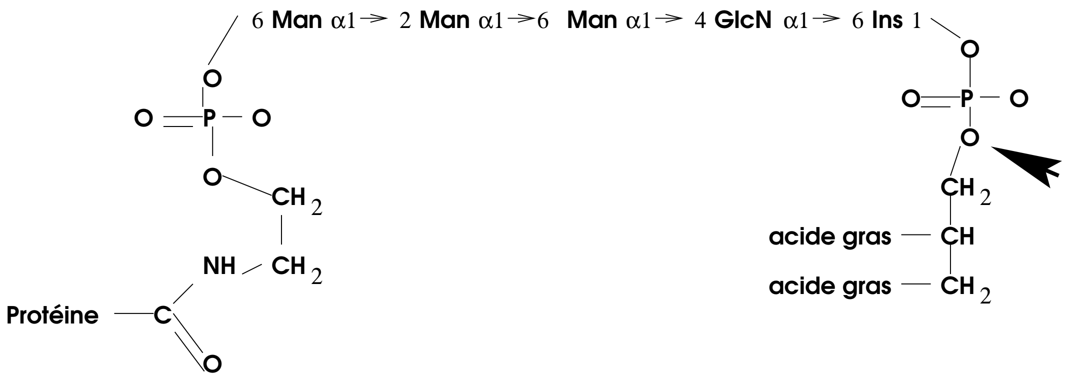

FIG. 0.1 - *Structure globale du pied d'ancrage glycosylphosphatidylinositol.*
Seule la structure globale présentée ici est conservée chez toutes les espèces; des glycosylations supplémentaires apparaissent souvent sur les mannoses, le noyau inositol porte parfois un acide gras supplémentaire [4]; la flèche indique la liaison hydrolysée par la PI–PLC.
légende : Man : mannose ; GlcN : glucosamine ; Ins : inositol

Les agglomérats protéolipidiques membranaires

Des résultats surprenants (et parfois contradictoires) ont été publiés récemment sur l'état physique dans lequel se trouvent les protéines à ancrage GPI dans les différentes membranes cellulaires. En effet, de fortes concentrations de ces protéines ont été décelées dans des amas protéolipidiques de surface et dans des organelles, les cavéoles [5]. Certains lipides de la membrane (les glycosphingolipides et le cholestérol en particulier) s'aggrègent et forment des plaques ou microdomaines, entraînant dans leur précipitation les protéines à ancrage glycolipidique. Il existe ainsi deux populations pour chaque protéine à GPI : une population de molécules libres et mobiles dans la membrane et une population de molécules immobilisées dans des amas lipidiques de haute densité protéique (de l'ordre de 30000 molécules/μm^2 contre 500 à 1000 dans la partie fluide de la membrane [6]). Cette dernière (entre 20 et 90 % selon les cas) est caractérisée par sa résistance à la solubilisation par le Triton X–100 1%, résistance qui disparaît si le cholestérol est extrait des membranes. Pour la PA, des mesures de mobilité montrent que 85 % environ de la protéine réside dans ces amas [7].

Un peu plus sur la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline a été choisie parce qu'elle est déjà bien connue du monde scientifique : exprimée sous des formes assez proches par les eucaryotes et les procaryotes, elle est connue des médecins (un fort taux sanguin de PA est un symptôme de certaines maladies des os) comme des cristallographes (on dispose de la structure aux rayons X de la forme exprimée chez *E. coli*[2]

2. La forme bactérienne de la PA est une protéine extracellulaire soluble.

[1]). De nombreuses études sur son activité et les différentes formes présentes chez l'homme ont été réalisées, motivées par les intérêts médicaux. D'un point de vue pratique, ses propriétés enzymatiques la rendent donc facile à identifier.

La PA est une phosphomonoestérase non spécifique qui hydrolyse les alcools phosphorylés en phosphate inorganique et alcool. L'enzyme active est un dimère portant des ions métalliques dans son site actif : deux ions Zn^{2+} et un ion Mg^{2+} dans la structure cristallisée de 450 acides aminés de *E. coli*, trois ions Zn^{2+} chez les mammifères. La fonction biologique de la protéine est mal connue : chez les bactéries, elle sert peut-être à fournir le phosphate inorganique lorsque la cellule en manque. Chez l'homme, c'est une ectoprotéine dont il existe au moins quatre gènes codant pour des isoformes exprimées dans différents tissus (intestin ; placenta ; cellules germinales ; rein, foie et os), qui subissent durant leur maturation glycosylations et glypiation.

Chapitre 1

Présentation de la méthode initiale

Le mode de purification élaboré par Anne Briolay et Muriel Bortolato comporte trois étapes :

- l'extraction à partir des tissus biologiques ;
- une chromatographie par immunoaffinité utilisant des anticorps de la phosphatase alcaline ;
- une chromatographie d'affinité par chelation de métaux.

1.1 L'extraction

La source de phosphatase alcaline utilisée est la muqueuse d'intestin de boeuf, choisie pour sa forte teneur en cette protéine sous sa forme glypiée. Pour éviter que la PA ne soit digérée par les enzymes présentes dans l'intestin, la protéine est extraite à $4°C$ et dans un tampon d'extraction auquel sont ajoutés des inhibiteurs de protéases (voir *Matériel et Méthodes* en annexe pour le détail des protocoles utilisés).

Au début du stage, l'étape d'extraction comportait les étapes suivantes :

- les morceaux d'intestin sont râclés de manière à récupérer la muqueuse. Après broyage, deux lavages permettent d' en éliminer par centrifugation le cytosol, et on récupère un culot de membrane.
- Le culot est ensuite délipidé par traitement avec un solvant organique (chloroforme/méthanol 1:2) puis sèché sous flux d'azote.
- Le culot séché contient les membranes des cellules du tissu initial partiellement dégradées par la délipidation, dont les membranes plasmiques portant encore les protéines à ancrage GPI. On les solubilise à l'aide d'un détergent doux : *l'octyl-βD-glucopyranoside* (OG) 40 à 60 mM.
- Les protéines solubilisées, dont la PA, sont enfin séparées des fragments membranaires en suspension par ultracentrifugation. On récupère le surnageant.

1.2 Chromatographie d'immunoaffinité (AcPA)

Avant de déposer l'échantillon extrait à l'étape précédente, il est nécessaire de le dialyser pour éliminer l'OG présent dans la solution. En effet, l'OG précipite dès que la concentration saline augmente et risquerait de colmater la colonne. Par contre, on utilise, pour la chromatographie, des tampons contenant un autre détergent doux, le Triton X–100 (noté Tx), à la concentration

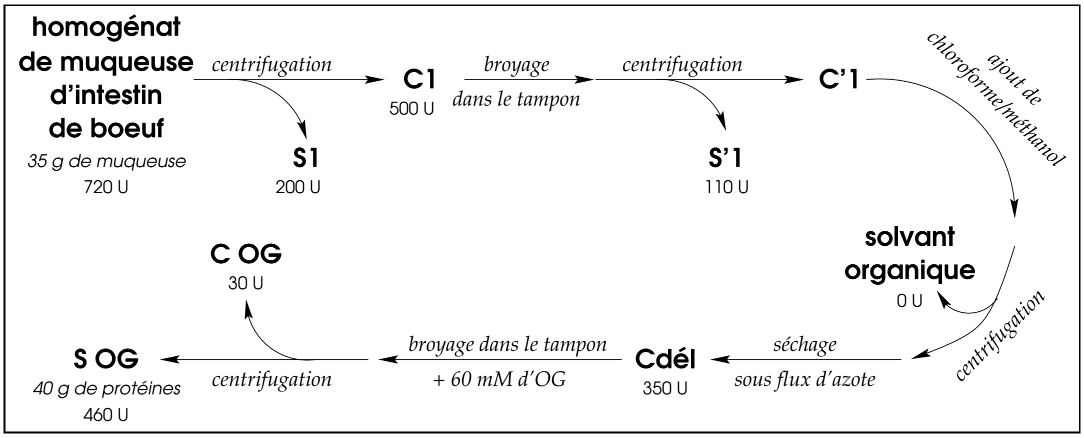

FIG. 1.1 - *Schéma d'extraction de la Phosphatase Alcaline d'intestin de bœuf*

faible de $0,1\%$[1] afin de prévenir d'éventuelles interactions non spécifiques entre contaminants et anticorps et de permettre une élution complète de la PA fixée sur le gel. Le Triton X–100 absorbe fortement dans l'ultraviolet et masque le signal d'absorption à 275 nm des protéines et des acides nucléiques. On évite ce problème en utilisant sa forme réduite.

La chromatographie s'effectue à 4^oC et comporte les trois étapes suivantes :

Charge à pH 7,4 La vitesse d'élution est choisie volontairement lente pour faciliter la fixation de la PA aux anticorps : 15 ml/cm^2/h.

Lavage à pH 10 Une première élution à pH 10 élimine les contaminants liés de façon non spécifique au gel de la colonne.

Elution à pH 11,5 L'élution finale à pH 11,5 décroche la PA. L'enzyme, très résistante aux pH alcalins (comme son nom le suggère), reste active dans ce tampon basique.

Les sorties de colonne sont dialysées contre TBS pour ramener le pH à 7,0 et éliminer, en partie au moins, le Triton X–100. Après concentration par dialyse contre le PolyEthylèneGlycol (PEG), une électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS en conditions dénaturantes met en évidence les produits et sous–produits présents dans chaque extrait.

1.3 Chromatographie d'affinité par chelation de métaux (IMAC)

Cette étape de la purification ne fait pas partie du sujet du présent travail : elle a seulement été l'occasion d'une initiation à la technique IMAC[2].

La colonne de chromatographie utilisée est un gel de polypropylène sur lequel sont greffés des bras chelatants capables de complexer efficacement les ions métalliques bivalents (ici, on utilise une solution de sulfate de cuivre pour activer la colonne).

Les ions métalliques ainsi immobilisés se lient aux protéines en particulier aux noyaux imidazole des résidus histidine et, dans une moindre mesure, aux résidus arginine et autres résidus basiques.

L'extrait (ici, l'extrait purifié de la chromatographie AcPA) est repris dans un tampon :

– légèrement basique pour favoriser l'adsorption des noyaux imidazole,

1. Le Triton étant un mélange de polymères de différentes longueurs, on ne peut pas donner de concentration molaire. Avec une masse molaire moyenne de 675 g/mol et une densité de 1,07, on obtient une molarité équivalente de 0,16 mM pour 0,1 %.

2. Immobilized Metal ions Affinity Chromatography

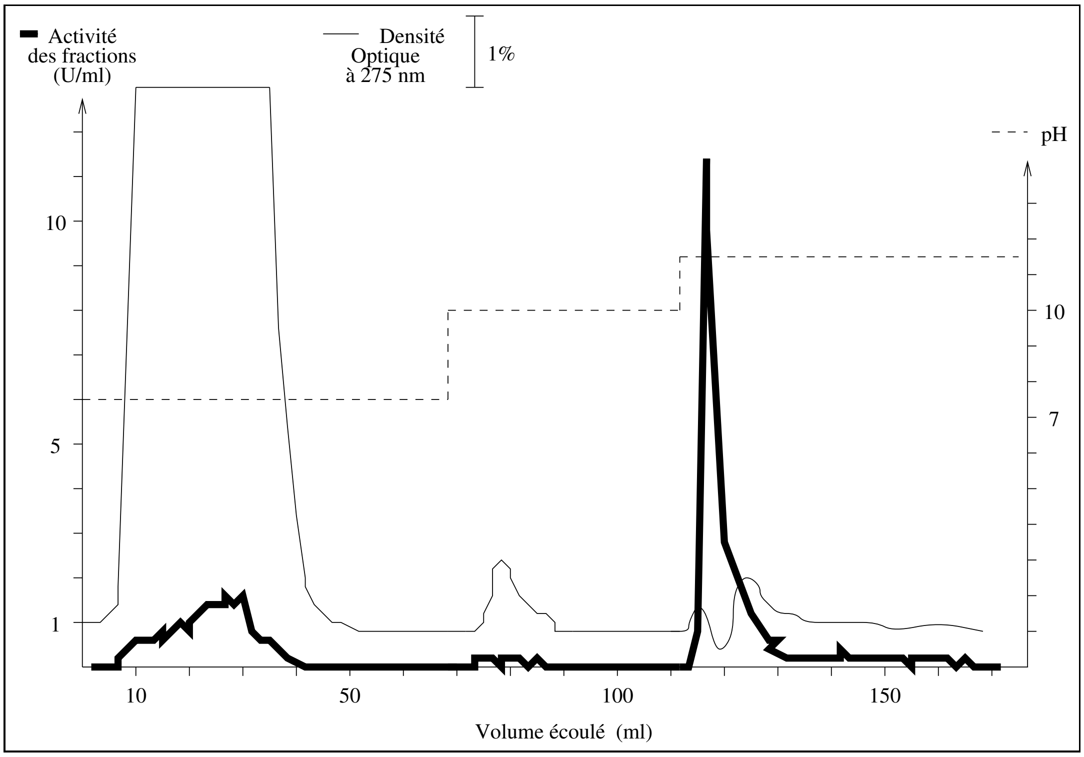

FIG. 1.2 - *Profil d'élution type d'une chromatographie AcPA.*
La courbe d'activité montre qu'une partie de la phosphatase alcaline introduite traverse la colonne sans s'y adsorber.

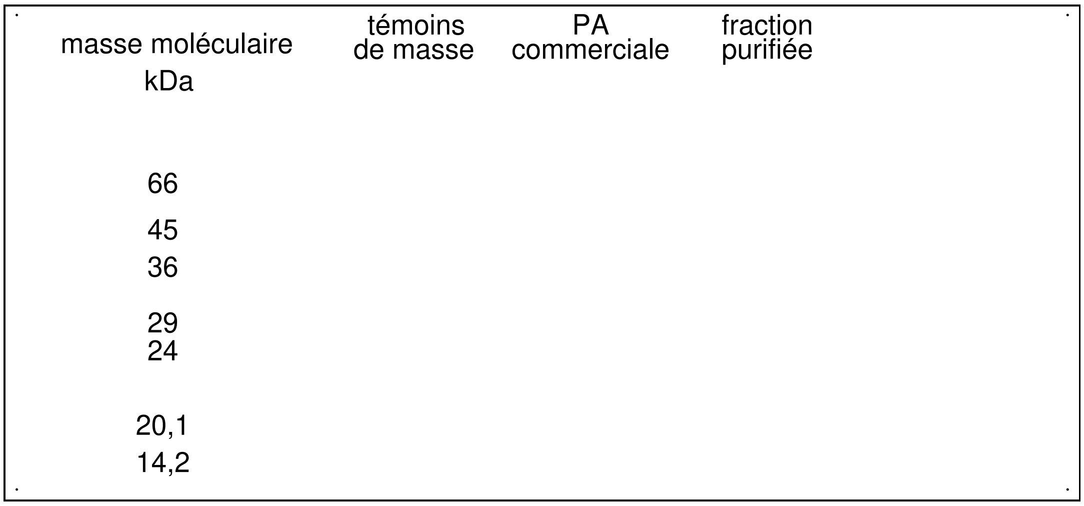

FIG. 1.3 - *Profils électrophorétiques des fractions purifiées par chromatographie d'affinité aux anticorps.*

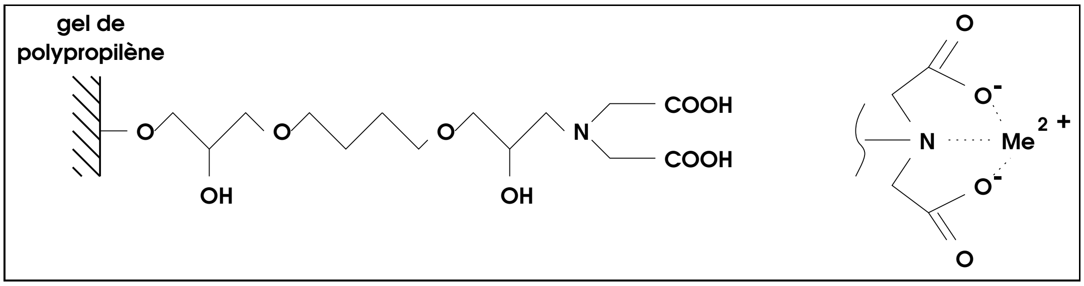

FIG. 1.4 - *Schéma des bras complexants du gel Chelating Sepharose Pharmacia et le mode de complexation des ions métalliques divalents.*

– et à forte teneur en chlorure de sodium (NaCl 1 M) pour éviter les interactions ioniques non spécifiques.

La colonne est ensuite lavée avec différents tampons qui éliminent les protéines contaminantes : un tampon à pH 6,7 et un tampon contenant un complexant compétitif des ions métalliques (la glucosamine). Une élution compétitive avec un tampon contenant de l'imidazole provoque la désorption de la PA. Enfin, une élution complexante à l'aide d'une solution d'EDTA débarasse la colonne des ions cuivre II et des traces protéiques restantes.

1.4 Une méthode insatisfaisante

La méthode de purification de la PA telle qu'elle était mise en œuvre au début du stage est peu reproductible. L'analyse électrophorétique (figure montre la présence de nombreux contaminants et les étapes suivantes de la purification ne sont pas satisfaisantes :

– D'une part, l'efficacité de la chromatographie AcPA n'est pas satisfaisante. Certes, l'opération ne provoque pas de pertes (la quantité totale de PA en sortie de colonne représente de 70 à 90% de la quantité déposée). Mais le rendement en PA purifiée (isolée lors de l'élution spécifique) reste aléatoire (de 40 à 80% de la quantité déposée). Les quantités très variables de PA adsorbée montrent que le fait que la protéine s'adsorbe partiellement n'est pas dû à un dépassement de la capacité de la colonne.

– D'autre part, la fraction purifiée par chromatographie AcPA contient encore de nombreux contaminants en proportions variables.

– Ces difficultés se retrouvent à l'étape de chromatographie IMAC (adsorption et purification mal contrôlées).

Le but du travail exposé ci–après a été de mieux comprendre et maîtriser la purification de la PA au cours des deux premières étapes. On s'est attaché à améliorer l'étape d'extraction ; on a cherché à obtenir une méthode reproductible de chromatographie par immunoaffinité ; enfin on s'est intéressé à la nature des contaminants de la phase purifiée par chromatographie.

Chapitre 2

Perfectionner l'extraction

Les profils électrophorétiques des fractions purifiées par chromatographie AcPA obtenus par Anne Briolay sont assez variables ; cependant, ceux des échantillons provenant de la même extraction se ressemblent. Cette remarque suggère que l'étape d'extraction elle–même est peu reproductible. Pour l'améliorer, les vitesses de centrifugation, le détergent et les types de lavage ont été successivement remis en question d'après les résultats bibliographiques.

2.1 Le Triton X–100 : un détergent commode et peu coûteux

L'OG a l'avantage d'extraire efficacement les protéines membranaires des lysats cellulaires et, du fait de sa concentration miscellaire critique élevée, il peut être facilement éliminé par dialyse. Mais il a des défauts : en particulier, il est assez coûteux et précipite à des concentrations salines même faibles. On a donc envisagé de le remplacer par le Triton X–100, un détergent doux meilleur marché. Le Triton X–100 est connu pour être moins efficace que l'OG et difficile à éliminer par dialyse, mais il ne dégrade pas la colonne AcPA. De plus, il est largement utilisé pour l'étude des protéines membranaires car il permet de solubiliser spécifiquement certains types de protéines membranaires (voir la partie sur les caveoles et amas protéiques membranaires).

2.2 Résultats : des lavages plus efficaces

Plusieurs protocoles de solubilisation des protéines membranaires par le Triton ont été expérimentés. Le premier préconise, après l'élimination des composants cytoplasmiques, un lavage au Triton X–100 1% à froid (0^oC) suivi de l'extraction des culots au Triton X–100 1% à chaud (37^oC)[2]. Ce protocole a été adapté par Anne Briolay pour un essai comparatif résumé dans la figure 2.1.

Après délipidation, le Triton, même à froid, est aussi efficace que l'OG : la PA est emportée dans les eaux de lavage (éch. n^o 4 et 7). Cette expérience a été confirmée par un deuxième essai de remplacement pur et simple de l'OG à 40 mM par le Triton X–100 1 % qui montre que les deux protocoles sont équivalents. Sans délipidation, le Triton se révèle incapable de solubiliser la PA, contrairement à l'OG (éch. n^o 1, 2 et 3) ; cependant, dans ce cas, le lavage au Triton n'est pas inutile car il améliore grandement la pureté de l'extrait (activités spécifiques des éch. n^o 1 et 3).

Un lavage au Triton X–100 1% a ensuite été introduit à la place du deuxième lavage de l'homogénat (voir le schéma 1.1), avant la délipidation. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.1 ; l'extrait se révèle plus pur s'il a subi un lavage au Triton.

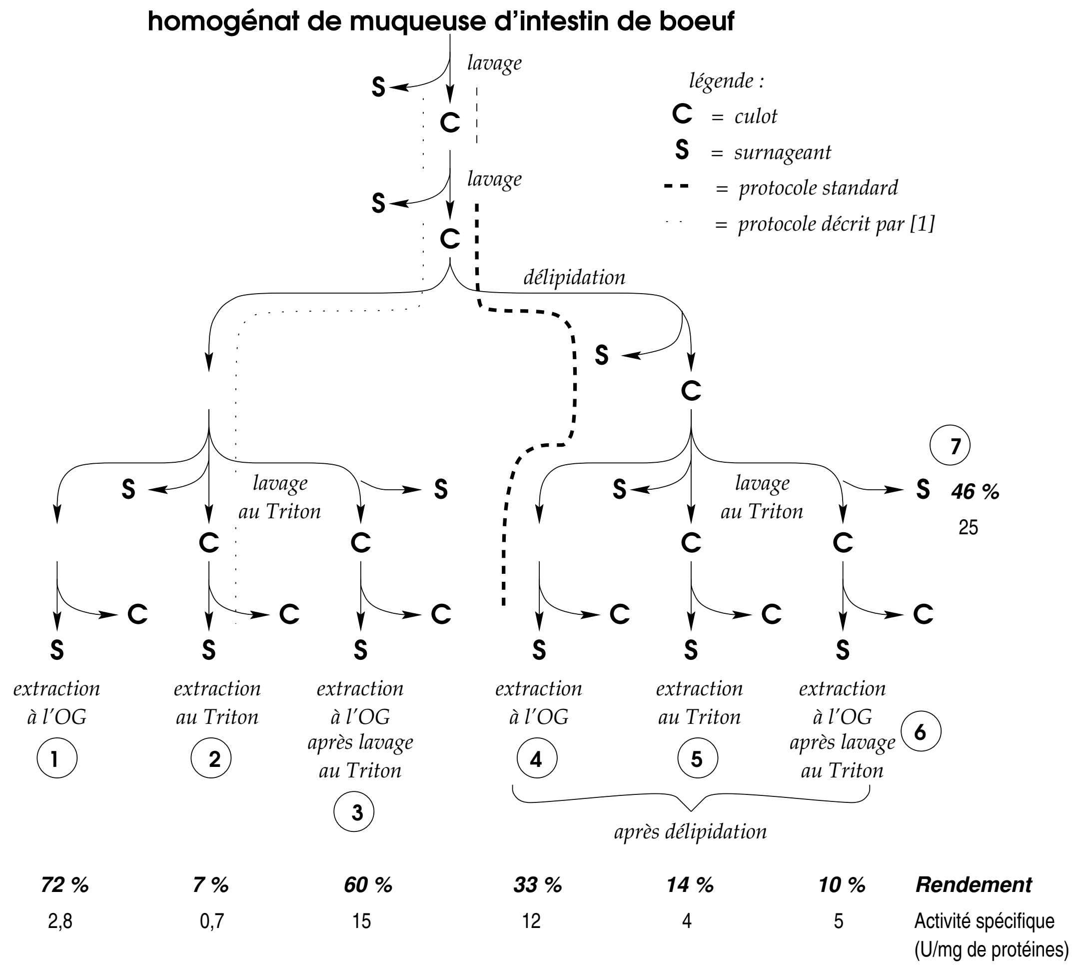

FIG. 2.1 - *Etude comparative de l'action des détergents OG et Tx*
La fraction lavée deux fois a été séparée en deux parties : l'une a subi une délipidation, l'autre est gardée comme témoin. Chacune est ensuite séparée en trois aliquotes soumis respectivement à :

- *une extraction par l'OG 40 mM, 30mn à 4°C ;*
- *un lavage au Tx 1 %, 20 mn à 0°C , puis une extraction par l'OG 40 mM, 30 mn à 4°C ;*
- *un lavage au Tx 1 %, 20 mn à 0°C , puis une extraction par Tx 1 %, 30 mn à 37°C.*

lavage Tx avant délipidation	détergent utilisé pour la solubilisation	Activité spécifique (U/mg de protéines)
non	OG 40 mM	15
oui	OG 40 mM	21
oui	Tx 1 %	61

TAB. 2.1 - *Introduction de Triton dans les lavages*

2.3 Eliminer le détergent

Le Triton X–100 comme l'OG peut précipiter lorsqu'il est très concentré dans des solutions salines. Il est donc peu recommandé d'introduire les échantillons extraits par 1 % de Triton X–100 dans la colonne de chromatographie AcPA. Or, ce détergent ne s'élimine pas facilement par dialyse. Il existe des colonnes de désalage par chromatographie, mais elles dénaturent certaines protéines [8]. Connaissant la résistance de la PA à des solvants organiques comme le chloroforme/méthanol, une élimination du Triton X–100 par extraction dans le chloroforme semble préférable : on extrait la solution par son volume de chloroforme ou de chloroforme/méthanol 2:1 ; les protéines floculent en un coussinet blanc à l'interphase ; après décantation, on retire le maximum de chloroforme à la pipette Pasteur ; une courte centrifugation (4600 g, 15 mn) permet en plus de concentrer les protéines ; après avoir retirer le surnageant aqueux à la pipette, les traces de chloroforme sont éliminées sous flux d'azote. Le transfert de phase du Triton est suivi par spectroscopie ultraviolette (le Triton X–100 a un pic d'absorption caractéristique à 276 nm avec un épaulement à 280 nm). Le coefficient de partage du Triton X–100 entre le chloroforme et l'eau a ainsi pu être évalué grossièrement à 300.

Ce traitement permet d'obtenir des extraits concentrés en PA (environ 10 U/ml) à faible teneur en Triton (autour de 0,03%), moyennant des pertes d'activité modérées (entre 14 et 22 %).

2.4 L'importance des ions

La forme placentaire de la PA est connue pour être très sensible à la concentration en ions métalliques ; la dialyse provoque de fortes pertes d'activité facilement évitées par l'ajout d'ions zinc et magnésium (concentrations optimales de 50 μM en chlorure de zinc II et 1 mM en chlorure de magnésium II, Olivier Nosjean, résultats non publiés). Une telle sensibilité aux ions métalliques n'avait pas été décelée pour la PA d'intestin de boeuf. Une nouvelle expérience d'incubation de divers échantillons de PA d'intestin de boeuf avec :

1. 50 μM $ZnCl_2$ et 1 mM $MgCl_2$ (pour l'influence des ions métalliques) ;
2. 10 mM de phosphatidylcholine (pour l'influence des phospholipides)

a été réalisée (tableau 2.2).

nature de l'échantillon	Activité du témoin	Incubation [a] avec Zn^{2+} et Mg^{2+}		Incubation avec la phosphatidylcholine	
		Activité	coef. d'activation	Activité	coef. d'activation
extrait à l'OG	4,0	4,7	1,2	4,0	1
extrait à l'OG dialysé	2,6	5,7	2,2	2,3	0,9
extrait au Tx 1%	26,9	29,3	1,1	30	1,1
fractions de colonne de chromatographie AcPA :					
charge [b]	0,07	0,13	1,9	0,07	1
élution	2,4	3,7	1,5	2,6	1,1

TAB. 2.2 - *Activité de la phosphatase alcaline d'intestin de bœuf en fonction de la présence d'ions ou de phospholipides.*

[a] Incubation durant 1h30 à 37°C.
[b] L'extrait déposé est un extrait à l'OG dialysé.

Les coefficients d'activation de la PA par la phosphatidylcholine montrent que ce phospholipide a peu d'effet sur l'activité de l'enzyme. Par contre, celle-ci se révèle sensible à la déplétion en ions zinc et magnésium provoquée par la dialyse contre des tampons dépourvus d'ions métalliques (éch. *n°* 2, 3, 5 et 6).

A la suite de cette expérience, zinc et magnésium ont été introduits dans tous les tampons utilisés. Heureusement, la déplétion de la PA d'intestin de bœuf en ions métalliques est lente et progressive : les résultats obtenus précédemment n'en sont que faiblement faussés.

Chapitre 3

Dompter la colonne aux anticorps

3.1 Adsorption de la protéine

Les résultats aléatoires des chromatographies AcPA font penser que la PA introduite dans la colonne n'est pas assez accessible aux anticorps. Considérons en effet le contenu des extraits : la PA (probablement accompagnée d'autres protéines à pied d'ancrage GPI) doit être solubilisée sous sa forme amphiphile. Il faut donc que le pied hydrophobe soit complexé par des éléments amphiphiles également pour devenir soluble. Comme le détergent d'extraction a été éliminé par dialyse, on peut supposer que ces amphiphiles sont des résidus de détergent mêlés à des lipides ou des lambeaux de membrane solubilisés en même temps que la PA, voire d'autres protéines regroupées en amas.

Ces hypothèses sont supportées par l'étude sur gel filtration de ces extraits qui donne pour la PA en solution des masses moléculaires équivalentes au moins trois ou quatre fois supérieures à la masse du monomère (66 kDa). La protéine native étant assemblée en dimère, la masse excédentaire serait fournie par d'autres amphiphiles agglutinés. Dans ces conditions, l'adsorption de la PA sur les anticorps serait partiellement empêchée, d'où la forte proportion de PA active non fixée par la colonne.

3.2 Vieillissement et ultrasons

Les expériences de chromatographie sur la colonne AcPA nous ont conduit à supposer que le "vieillissement" de ses échantillons pouvait améliorer l'adsorption. À travers plusieurs expériences comparatives, nous avons pu montrer que cette hypothèse était erronée :

1. par comparaison des chromatographies d'un extrait ancien (conservé 9 mois au congélateur) et d'un extrait frais ;

2. par comparaison des chromatographies successives de trois aliquotes du même extrait : l'un déposé frais, un autre conservé une semaine à $4°C$ puis 3 jours à température ambiante, le dernier traité par des congélations et décongélations successives dans l'azote liquide ("vieilli").

Les résultats, rassemblés dans le tableau 3.1, montrent que le vieillissement diminue l'adsorption de la protéine et provoque des pertes globales d'activité.

L'effet des ultrasons sur l'adsorption de la protéine a ensuite été testé par deux expériences comparatives présentées dans le tableau 3.2. La première compare les chromatographies de deux échantillons extraits par deux détergents différents, la seconde, deux aliquotes du même extrait.

La sonification améliore nettement la fixation de la PA sur la colonne ; les chromatographies suivantes sont donc systématiquement effectuées sur des échantillons sonifiés.

exp.	éch.	% de PA [a] récupérée [b] dont :	% de PA non fixée [c]	% de PA éliminée au lavage [d]	% de PA purifiée [e]
1	frais	82	26	2,4	73
	ancien	60	25	0,5	74,5
2	frais	91	34	1	65
	conservé à l'ambiante	94	21	1	78
	"vieilli"	80	54	1	45

TAB. 3.1 - *Résultats de l'étude sur l'effet du vieillissement des extraits*
Pour faciliter les comparaisons, les trois colonnes de droite sont ramenées à un total de 100%.

[a] en terme d'activité enzymatique.
[b] Total sur toutes les fractions.
[c] récupérée dans les fractions de tampon à pH 7,5.
[d] récupérée dans les fractions de tampon à pH 10.
[e] récupérée dans les fractions de tampon à pH 11,5.

exp.	éch.	% de PA récupérée dont :	% de PA non fixée	% de PA éliminée au lavage	% de PA purifiée
1	SOG sonifié	109	0,6	0,9	98,5
	STx témoin	90	18	1	81
2	SOG sonifié	110	11	1	88
	SOG témoin	130	17	2	81

TAB. 3.2 - *Essais comparatifs sur l'influence de la sonification*

3.3 Débit d'élution

L'écoulement hydrodynamique de la solution d'antigène dans la colonne d'anticorps n'est pas sans effets sur la cinétique de reconnaissance de l'un par l'autre : une plus grande vitesse d'élution défavorise la complexation en diminuant le temps de contact. Or, les protéines sont des particules volumineuses, à plus forte raison les complexes protéines/anticorps formés dans la colonne. Une trop forte complexation risque donc de colmater les pores du gel d'agarose (bien que les pores de Sépharose 4B aient une limite d'exclusion de l'ordre de 20 MDa, des amas glycolipidiques peuvent se former). Si la concentration d'antigène dans l'extrait diminue et si la vitesse d'écoulement du liquide dans le gel augmente, la protéine se trouve plus dispersée dans la colonne ce qui évite de tels encombrements.

D'après les quelques résultats rassemblés dans le tableau 3.3, il semble que des débits importants (plus de 20 ml/cm^2/h au lieu des quelques 10 ml/cm^2/h préconisés par les notices techniques Pharmacia pour les chromatographies sur immunoadsorbants) soient indispensables dans notre cas.

exp.	détergent d'extraction	Débit d'élution (ml/cm^2/h)	% de PA récupérée	% de PA non fixée	% de PA éliminée au lavage	% de PA purifiée
1	OG 40mM, dialysé	16	90	34	1	65
2	Tx 1%, dialysé [a]	18,5	90	18	1	81
3	Tx 1%, dialysé et dilué au 5^e	21	non calculé	0	0	100
4	Tx 1%, dilué au 10^e	22	108	0	0	100
5	Tx 1%, dilué au 10^e	30	74	0,5	0,5	99

TAB. 3.3 - *Dilution et débit d'élution*

[a] On a pu vérifier par spectroscopie UV que la concentration en Triton avait à peine diminué lors de la dialyse.

Chapitre 4

Etude des contaminants

Les fractions purifiées par chromatographie d'immunoaffinité sont enrichies en PA mais des contaminants apparaissent toujours sur les gels d'électrophorèse SDS–PAGE (voir figure 1.3). Avec la bande de la PA à 66 kDa, apparaissent des bandes à 49, 44, 42, 39, 31, 23 et 25 kDa[1]. Différents tests ont été effectués sur des échantillons purifiés pour tenter de mieux cerner ces contaminants. En particulier, on cherche à savoir s'il peut s'agir de segments de la PA endommagée par d'éventuelles protéases ou par le séjour dans le tampon d'élution à pH 11,5 (peu de protéines résistent à des pH aussi basique).

4.1 Détection d'un pied GPI

L'expérience a été menée sur une fraction purifiée par chromatographie AcPA avec un seul contaminant visible : la bande à 31 kDa, auquel on a fait subir le test de digestion par la PI–PLC.

Le test s'est avéré négatif (pas de déplacement de la bande : voir le schéma 4.1). On ne peut pas conclure à l'absence de pied GPI car certaines protéines à pied GPI sont insensibles à la PI–PLC (probablement à cause d'un ester d'acide gras supplémentaire sur l'inositol). Cependant, il est improbable qu'il s'agisse d'un segment de la PA portant le pied GPI car la PA donne un test positif avec la PI–PLC.

Fig. 4.1 - *Gel d'électrophorèse d'un échantillon incubé avec la PI–PLC.*

1. Les masses sont évaluées approximativement à partir d'un mélange de protéines de masses connues servant d'échelle.

4.2 Séquençage

La bande à 31 kDa a pu être isolée sur membrane de Difluorure de Polyvinylidène (PVDF) par transfert électrophorétique d'un gel SDS PAGE. Elle a fait l'objet d'une tentative de séquençage avortée car la protéine est protégée à son extrêmité N–terminale. On peut penser à la cyclisation interne d'un résidu glutamique (la protéine pourrait alors être le produit d'une dégradation par protéolyse) ou à une estérification par un acide gras myristoyle (l'hypothèse d'un produit de dégradation de la PA serait alors exclue).

4.3 Immunorévélation aux anticorps de la phosphatase alcaline

Plusieurs échantillons purifiés ont été analysés par électrophorèse SDS PAGE suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose puis d'une immunorévélation. Aucune bande en dehors de celle de la phosphatase alcaline n'a été révélée.

D'après ces résultats, on conclut que les contaminants ne sont pas apparentés à la PA. S'ils se trouvent dans la fraction purifiée par chromatographie d'immunoaffinité, c'est qu'ils se fixent à la PA adsorbée ou aux anticorps AcPA ou encore à des anticorps contaminants. On peut aussi craindre que la fine bande à 23 kDa soit une chaîne légère d'immunoglobuline provenant de la dégradation des anticorps greffés sur la colonne.

Conclusion : mise au point d'un protocole efficace

L'extraction sélective de la phosphatase alcaline d'intestin de bœuf a pu être grandement améliorée en tirant profit des propriétés particulières des protéines à pied d'ancrage GPI : dans le lysat cellulaire, la PA est en majorité immobilisée dans les agglomérats protéolipiques (amas et cavéoles) des membranes plasmiques. Elle est alors insoluble dans le Triton X–100 1%, contrairement aux protéines membranaires libres qui peuvent être éliminées par un lavage avec ce détergent. On détruit ensuite les agglomérats lipidiques par délipidation. La PA libérée est alors solubilisée par un nouvel ajout de détergent.

En modifiant les paramètres physiques de la chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps, on a pu rendre cette étape de purification aussi efficace que possible : la sonification déstabilise les complexes hydrophobes qui masquent la PA à ses anticorps ; un débit d'écoulement élevé prévient les risques de colmatage des pores du gel. L'amélioration de la purification a rendu l'étude des contaminants sans doute moins primordiale. Si on ne les a pas identifiés, il semble cependant qu'il ne soient pas les produits d'une dégradation de la PA au cours de la purification.

Le travail exposé ci–devant s'est terminé par la mise au point du protocole de purification de la phosphatase alcaline d'intestin de bœuf fourni en page suivante. Des mesures d'activité spécifique ont permis d'évaluer le coefficient de purification à plus de 1000 ([2]) pour l'extraction suivie de la chromatographie AcPA. Des essais répétés ont montré que cette méthode donne des résultats reproductibles. L'étape de chromatographie IMAC doit permettre d'améliorer encore cette purification déjà bien entamée.

2. La faible précision des mesures ne permet pas de fournir plus d'un chiffre significatif ; se reporter à l'annexe technique pour les méthodes utilisées.

Préparation de la Phosphatase Alcaline d'intestin de boeuf

Extraction

TAMPON D'EXTRACTION T :

TBS pH 7,4
+ $ZnCl_2$ 50 μM, $MgCl_2$ 1 mM
+ inhibiteurs de protéases :
pepstatine, leupeptine, aprotine, antipaïne, benzamidine 1 mM, PMSF 0,25 mM
(1 l suffit)

Décongeler 50 à 100 g de morceaux d'intestin de boeuf dans du sérum physiologique. Râcler la muqueuse et la broyer dans autant de tampon T que le permet le rotor utilisé (160 à 240 ml finaux).

CENTRIFUGATION : 30000 g 4 $°C$ 30 mn

Les culots sont rebroyés dans autant de tampon T que possible et la suspension obtenue est portée à 1% de Triton X–100. Placer sous agitation pendant 1 h à 4 $°C$.

CENTRIFUGATION : 30000 g 4 $°C$ 30 mn

Les culots sont délipidés au chloroforme/méthanol 1:2, à raison de 4 ml/g, à l'ambiante, sous agitation pendant 45 mn.

CENTRIFUGATION : 1300 g (2500 rpm) 8 mn

Laisser sècher le culot sous flux d'azote (45 mn) avant de le reprendre dans quelque 40 à 80 ml de tampon T (broyage au *Virtis*). La suspension obtenue est portée à 1% de Triton X–100 et laissée sous agitation pendant 1 à 2 h à 4 $°C$. Centrifuger pour récupérer la phase liquide :

CENTRIFUGATION : 120000 g 4 $°C$ 30 mn

Chromatographie d'immunoaffinité (AcPA)

TAMPONS D'ÉLUTION :

TBS– TrisHCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 + $ZnCl_2$ 50 μM + $MgCl_2$ 1 mM

TBS+ TBS– + 0,1% Triton X–100 réduit

AMP+ AminoMéthylPropanol 0,8 M, pH 10 + $ZnCl_2$ 50 μM + $MgCl_2$ 1 mM + 0,1% Triton X–100 réduit

DEA+ DiEthylAmine 50 mM, pH 11,5 + $ZnCl_2$ 50 μM + $MgCl_2$ 1 mM + 0,1% Triton X–100 réduit

ECHANTILLON : STx est dilué au 1/10^e dans du tampon TBS– puis passé au bain à ultrasons pendant 7 à 12 mn.

Equilibrage de la colonne au TBS+, charge et élutions au TBS+ puis AMP+ se font au débit de 30 ml/h/cm^2. L'élution de la phosphatase alcaline par le tampon DEA+ est meilleure à un débit plus lent (de 30 à 4 ml/h/cm^2). Enfin, laver la colonne au TBS+.

Bibliographie

[1] E. E. KIM, H. W. WYCKOFF (1991), *J. Mol. Biol.*, 218, 449:464

[2] CAIN (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1235, 69:78

[3] A. M. HOOPER, A. J. TURNER (1988), *Biochem. J.*, 250, 865:869

[4] M. A. J. FERGUSON (1994), *Parasit. Today*, 10, 48:52

[5] D. A. BROWN (1992), *Trends Cell Biol.*, 2, 338:342
R. G. W. ANDERSON (1993), *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 647:652

[6] D. L. KOOYMAN (1995), *Science*, 269, 89:92

[7] D. P. CERNEUS (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 3150:3155

[8] P. E. CLARK, M. A. MOSCARELLO (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, 859, 143:150

[9] M. G. LOW (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 988, 427:454

[10] CYBORON, WUTHIER (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 7262:7268

[11] LOWRY *et al.* (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265:275

[12] READ, NORTHCOTE (1981), *Anal. Biochem.*, 116, 53:64

[13] LAEMMLI (1970), *Nature*, 227, 680:685

Annexe A

Revue introductive sur les protéines à pied GPI

Annexe B

Matériel et méthodes

B.1 Dosage enzymatique de la PA

Le PNPP est hydrolysé en PNP (jaune en milieu alcalin) par la PA [10]. Dans un tampon glycine 25 mM pH 10,4 contenant le PNPP 10mM, à $37°C$, la réaction enzymatique est induite par l'addition de la solution de PA, suivie par l'évolution de la densité optique à 420 nm. Un témoin corrige l'effet d'une éventuelle hydrolyse non spécifique du PNPP. La concentration de PNP est obtenue avec la valeur ϵ = 18,5 mM^-1cm^-1. Spectrophotomètre utilisé : Kontron Uvikon 810

B.2 Dosages protéiques

B.2.1 Précipitation et délipidation d'un échantillon protéique

La précipitation et la délipidation sont nécessaires pour que les sels minéraux, les détergents et les tampons n'interfèrent pas dans les dosages des protéines. Après tous les lavages suivants, on élimine le surnageant à la pipette Pasteur après 2 mn de centrifugation à 10000 g (centrifugeuse *Eppendorf*) : deux lavages par 1 ml d'acide TriChloroAcétique (TCA) 10%, puis un lavage par 1 ml de méthanol, puis deux lavages par 1 ml de méthylal/méthanol 4:1. Le dernier culot est repris dans 100 à 200 μl de soude molaire.

B.2.2 Dosage protéique par la méthode de Lowry

Le complexe cuproprotéique formé en milieu alcalin réduit le réactif de Folin–Ciocalteu qui développe une couleur bleue [11]. Après précipitation et délipidation, 200 μl de solution protéique sont ajoutés à 2 ml de réactif A et 200 μl de réactif B. On prépare en parallèle une gamme étalon de 0 à 100 μg de protéine avec une solution mère de BSA.

A 0,5 ml de tartrate double de sodium et potassium 2% (P/V)
+ 0,5 ml de sulfate de cuivre II 1% (P/V)
+ Na_2SO_3 2% (P/V) dans la soude décimolaire qsp 50 ml

B réactif de Folin-Ciocalteu dilué de moitié

Après agitation, les échantillons sont laissés 30 mn à l'obscurité. La densité optique est lue à 550 nm.

B.2.3 Dosage protéique par la méthode de Bradford

La fixation du bleu de Coomassie sur les protéines déplace le maximum d'absorption du colorant de 465 nm à 595 nm [12]. Cette méthode peut être utilisée directement sur les échantillons protéiques mais elle est faussée par la présence de certains détergents (comme le Triton X–100).

Une solution mère de colorant est préparée à partir de 1 g de Serva Blue G250 dissous dans 200 ml d'acide orthophosphorique 84% (P/P) et 100 ml d'éthanol 95%. La solution de colorant est obtenue avec 3 ml de solution mère, 8 ml d'acide orthophosphorique 85%, 4ml d'éthanol 95%, complétée à 60 ml par de l'eau distillée. On mélange 400 μl de solution protéique à 600 μl de colorant (gamme étalon de 0 à 10 μg de BSA). La densité optique est lue à 595 nm après 2 mn.

B.2.4 Dosage protéique par la méthode de Pierce BCA

En solution alcaline, les protéines réduisent le cuivre II en cuivre I. Cu^+ forme avec le BCA un complexe pourpre, BCA.Cu^+ qui absorbe à 562 nm. On utilise le kit et le protocole de dosage PIERCE BCA.

B.3 Extraction

L'intestin bovin, fourni par les abattoirs, est extemporanément lavé et débité. On établit un profil d'activité PA de l'intestin et les morceaux les plus riches sont conservés par -80^oC.

TAMPON D'EXTRACTION T : TBS (TrisHCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4) + inhibiteurs de protéases :
pepstatine 1 μg/l, leupeptine 1 μg/l, aprotine 1 μg/l, antipaïne 1 μg/l, benzamidine 1 mM, PMSF 0,25 mM

On décongèle 50 à 100 g de morceaux d'intestin de boeuf dans du sérum physiologique. La muqueuse râclée est broyée (broyeur ménager *Waring Blendor*) dans le tampon T (2 à 3 ml/g de muqueuse). L'homogénat obtenu est centrifugé :

CENTRIFUGATION : 30000 g 4 ^oC 30 mn
centrifugeuses utilisées : Beckman L5-50B, Kontron TGA 65
rotors utilisés : Beckman 70Ti et 50.2Ti, Kontron 65.38

Les culots sont rebroyés dans le tampon T (même appareil, même volume que précédemment) et centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment.

Les culots sont délipidés au chloroforme/méthanol 1:2, à raison de 4 ml/g, à température ambiante, sous agitation pendant 45 mn.

CENTRIFUGATION : 1300 g 4 ^oC 8 mn
centrifugeuse utilisée : Jouan GR 4.11

Le culot est sèché sous flux d'azote (45 mn) et repris dans le tampon T (broyage au *Virtis Homogenizer*). Après addition du détergent, la suspension obtenue est laissée sous agitation pendant 1 à 2 h à 4 ^oC.

CENTRIFUGATION : 120000 g 4 ^oC 30 mn

B.4 Chromatographie

B.4.1 Colonne AcPA

Quelques milligrammes de PA commerciale (sans ancrage GPI) sont fixés sur un gel de Sépharose 4B activée au bromure de cyanogène (produit et protocole Pharmacia). Un mélange polyclonal d'anticorps spécifiques de la PA est obtenu par chromatographie d'un sérum sanguin de lapin infecté par la PA commerciale sur cette colonne. Ce mélange (4 mg de protéines) est fixé sur 5,5 g de gel Sépharose 4B selon la méthode précédente et coulée dans une colonne de 1 cm^2 de section.

La colonne est conservée à 4^oC dans un tampon TBS + NaN_3 0,05% (P/V).

B.4.2 Chromatographie d'affinité AcPA

TAMPONS D'ÉLUTION :

TBS TrisHCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4

TBS+ TBS + 0,1% Triton X–100 réduit

AMP+ 2–Amino–2–MéthylPropan–1–ol 0,8 M, pH 10 + 0,1% Triton X–100 réduit

DEA+ DiEthylAmine 50 mM, pH 11,5 + 0,1% Triton X–100 réduit

Equilibrage de la colonne au TBS+; charge et élutions au TBS+ puis AMP+; élution finale au DEA+; les débits utilisés varient de 15 à 30 ml/cm^2/h.

Dialyse des échantillons contre TBS.

B.5 Analyse électrophorétique

B.5.1 Electrophorèse SDS–PAGE

En conditions dénaturantes, le SDS déroulent les protéines et se fixent par des interactions hydrophobes aux résidus de la chaîne peptidique. La protéine est alors fortement chargée négativement et migre vers le pôle positif en présence d'un champ électrique [13].

L'échantillon protéique est repris dans un tampon Tris HCl 62,5 mM (pH 6,8) contenant 1% de SDS, 10% de glycérol et 5% de $beta$–mercaptoéthanol. Les protéines sont déposées sur un gel de concentration dans lequel la migration est rapide. Puis elles atteignent dans un gel de résolution plus dense : après concentration à l'interface, elles migrent sous la forme d'une fine bande. On utilise le kit d'électrophorèse Mini–PROTEAN (Bio–Rad) avec la composition des gels suivante :

gel de concentration acrylamide 4%, méthylène–bis–acrylamide 0,11%, Tris HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 0,1%, Temed 0,1%, Persulfate d'ammonium 0,05%

gel de résolution acrylamide 7,5%, méthylène–bis–acrylamide 0,2%, Tris HCl 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1%, Temed 0,05%, Persulfate d'ammonium 0,033%

tampon de migration TrisHCl 62,5 mM, SDS 1%

migration 200 V durant 50 mn

La révélation au nitrate d'argent est obtenue à l'aide du kit de révélation Silver Stain Plus (Bio–Rad).

B.5.2 Echelle de masse moléculaire pour électrophorèse

Le mélange de marqueurs de masse moléculaire servant d'échelle pour les électrophorèses SDS–PAGE contient les protéines suivantes :

- albumine de sérum bovin (66 kDa)
- ovalbumine (45 kDa)
- glycéraldéhyde–3–phosphate déshydrogénase (36 kDa)
- anhydrase carboxylase (29 kDa)
- trypsinogène (24 kDa)
- inhibiteur de la trypsine (20,1 kDa)
- $alpha$–lactalbumine (14,2 kDa).

B.5.3 Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après électrophorèse SDS–PAGE, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose par une migration élestrophorétique du gel vers la membrane dans un tampon TrisHCl 25 mM, glycine 0,2 M, méthanol 20% (75 V, 30 à 45 mn). La membrane peut ensuite subir une immunorévélation.

Le protocole est le même dans le cas d'une membrane de PVDF.

B.5.4 Immunorévélation

La membrane est successivement :

1. saturée en protéines par un tampon TBS contenant 1% de BSA en présence d'un détergent, le Tween 0,05%;

2. incubée dans une solution d'anticorps de lapin dirigés contre la PA (solution commerciale diluée au 1000^e) ;

3. incubée dans une solution d'anticorps dirigés contre les Immunoglobulines G de lapin et fixés à une peroxydase (solution commerciale diluée au 1000^e).

Il existe plusieurs révélateurs de la peroxydase en présence d'eau oxygénée : le 4–chloro–1–naphtol (2 mg dilués dans 4 ml de méthanol, 30 μl d'eau oxygénée 35% et 16 ml de TBS, à l'abri de la lumière) et la diamminobenzidine (2 mg dilués dans 10 ml de TBS et 3 μl d'eau oxygénée 35%).

B.5.5 Digestion par la PI–PLC

L'échantillon est incubé avec la PI–PLC bactérienne commerciale (PI–PLC de *Bacillus thuringiensis* de OxfordGlycoSystems) pendant 4h à 37^oC, dans un rapport de 0,15 unités de PI–PLC par unité de PA. On contrôle l'effet de la PI–PLC par électrophorèse SDS–PAGE avec des échantillons témoins. Les échantillons ne sont pas portés à ébullition avant leur dépôt sur le gel d'électrophorèse.